

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На V редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Биолошког факултета, одржаној 08.03.2019. године, на основу молбе ментора др Предрага Вујовића одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Тамаре Б. Дакић**, истраживача сарадника, Биолошког факултета Универзитета у Београду, под насловом „**Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова**“, у саставу:

1. др Предраг Вујовић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет-ментор
2. др Тања Јевђовић, доцент, Универзитет у Београду-Биолошки факултет- члан
3. др Ивана Бјелобаба, виши научни сарадник, Универзитет у Београду-Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“-члан

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Биолошког факултета подноси следећи

### ИЗВЕШТАЈ

#### **Општи подаци о докторској дисертацији:**

Докторска дисертација Тамаре Дакић под насловом „Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова“, урађена је на Биолошком факултету Универзитета у Београду, у оквиру пројекта под бројем ОИ173023, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја, Републике Србије, а чији је руководилац др Јелена Ђорђевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Докторска дисертација написана је на 92 стране куцаног текста и подељена је у уобичајена поглавља: Увод (19 страна), Циљеви истраживања (2 стране), Материјал и методе (16 страна), Резултати (20 страна), Дискусија (18 страна), Закључци (1 страна) и Литература (16 страна). Дисертација укључује 21 слику и 3 табеле. У дисертацији је цитирана 241 библиографска јединица. Докторска дисертација садржи и податке о менторима и члановима комисије, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница, садржај, биографију аутора и потписане изјаве о ауторству, коришћењу и истовестности штампане и електронске верзије доктората.

#### **Полазне основе истраживања обухваћених овом тезом:**

Гладовање је дефинисано као стање у којем постапсорптивна јединка, вољна да једе, није у могућности да задовољи ову потребу због ограничења наметнутих из спољашње средине. Насупрот томе, за инсулин је одавно познато да се постпрандијално ослобађа из панкреаса, и да повећава стопу олакшане дифузије глукозе из циркулације у циљна ткива (скелетни мишићи, масно ткиво). Дуго је сматрано да је централни нервни систем (ЦНС)

неосетљив на дејство инсулина, али су бројна истраживања временом потврдила присуство инсулина и рецептора за инсулин у мозгу. Првобитно је сматрано да инсулин детектован у ЦНС искључиво периферног порекла. У прилог овој тврдњи ишло је и откриће да инсулин пролази кроз крвно-моздану баријеру рецептор-посредованом ендцитозом. Међутим, у бројним студијама потврђено је присуство информационе РНК (иРНК) за препроинсулин I и II у фетусном, неонаталном и адултном мозданом ткиву пацова. Додатно, *in vitro* експериментима показано је да неурони могу секретовати инсулин након хемијски изазване деполаризације ћелијске мембране. Сва ова и многа друга истраживања иду у прилог хипотези да је бар део инсулина присутан у ЦНС локално синтетисан.

Сигнални путеви које инсулин активира у ћелијама периферних ефекторских ткива су интензивно испитивани у циљу проналажења механизма који леже у основи инсулинске резистенције. Будући да је мозак дуго сматран органом који није подложен дејству инсулина, мање пажње је посвећено проучавању инсулинске сигнализације у ЦНС. Ипак, познато је да постоје одређене разлике између инсулинског сигналног пута у мозгу и периферним органима.

Инсулин остварује бројне ефекте активацијом рецептора који испољава тирозин-киназну активност. Након везивања инсулина, долази до аутофосфорилације рецептора који потом фосфорилише супстрат инсулинског рецептора (енг., Insulin Receptor Substrate, IRS). IRS1 углавном учествује у регулацији глукозног метаболизма у периферним ткивима, док је IRS2 укључен у регулацију развоја одређених мозданих структура, контролу уноса хране и потрошње енергије. Након активације ових молекула, могу бити покренута два главна сигнална пута: PI3K-АКТ/ПКВ (енг., Phosphatidylinositol 3- Kinase, PI3K; Protein Kinase B, PKB), углавном везан за метаболичке ефекте инсулина и Ras-МАРК (енг., Mitogen Activated Protein Kinases, MAPK), који регулише експресију гена укључених у раст и диференцијацију.

Мембрански транспорт глукозе у ћелијама мозга углавном је независан од дејства инсулина. Најзаступљеније изоформе глукозног транспортера (GLUT) у мозгу су инсулин-независни GLUT1 и GLUT3, али детектовано је присуство и инсулин-зависног GLUT4. Иако је познато да се ове форме глукозног транспортера експримирају у ЦНС, литературни подаци који говоре о анатомској локализацији и типу ћелија које их експримирају нису доследни.

### **Анализа докторске дисертације:**

Докторска дисертација кандидаткиње Тамаре Б. Дакић обухвата уобичајена поглавља. Прво поглавље **УВОД** подељено је у 4 целине и садржи 3 илустрације. У оквиру овог поглавља кандидаткиња се прво бави темом регулације енергетске хомостазае, са посебним освртом на улогу различитих региона хипоталамуса у овом процесу. Затим је дат увид у физиолошке процесе који се дешавају током различитих фаза метаболичког одговора на гладовање. Аутор потом описује механизме регулације синтезе и секреције инсулина, са посебним освртом на порекло и функцију овог хормона у мозгу. Систематичним прегледом литературних података, истакнуто је како се у складу са новим открићима мењао статус инсулина од хормона који искључиво синтетише у панкреасу и делује на периферна ткива, преко хормона за који се зна да бива транспортован кроз крвно-моздану баријеру, до хормона за који је познато да се синтетише и у ЦНС. На крају целине везане за инсулин, дат је и преглед сигналних путева који у ефекторским ткивима могу бити активирани дејством инсулина. У последњој целини уводног поглавља аутор

описује различите аспекте глукозног метаболизма у мозгу, са посебим акцентом на типове ћелија које експримирају различите изоформе GLUT у различитим регионима хипоталамуса. С обзиром на ограничену способност мозга да складишти енергију, на крају уводног поглавља такође је направљен осврт и на значај гликогена као резервног енергетског депоа у овом органу.

У поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** концизно су дефинисани циљеви ове докторске дисертације, који обухватају: 1. испитивање утицаја краткотрајног гладовања на експресију иРНК за инсулин и количину инсулина у хипоталамусу; 2. утврђивање анатомске локализације проинсулинске и инсулинске имунопозитивности у хипоталамусу контролних и изгладњиваних јединки; 3. утврђивање типа ћелија које испољавају проинсулинску имунопозитивност, 4. анализа експресије, анатомске дистрибуције различитих изоформи глукозног транспортера у хипоталамусу контролних и изгладњиваних јединки, као и типа ћелија које их експримирају, и 5. испитивање адаптивног значаја краткотрајним гладовањем индукованих промена у експресији инсулина у хипоталамусу.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** обухвата детаљно приказане експерименталне протоколе и методолошке приступе који су коришћени у овој докторској дисертацији. Детаљно је описан дизајн експеримента, као и поступци руковања експерименталним животињама у складу са препорукама и одборењем Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Биолошког факултета Универзитета у Београду (решење бр. ЕК-ВФ-2017/05). У оквиру овог поглавља детаљно су описани протоколи у вези са следећим поступцима и методама: изоловање серума, цереброспиналне течности и ткива, одређивање концентрације глукозе, лактата и инсулина у серуму и цереброспиналној течности, одређивање концентрације кортикостерона у серуму, одређивање концентрације инсулина у хомогенатима ткива, одређивање количине гликогена у јетри и хипоталамусу, изоловање укупне РНК и синтеза комплементарне ДНК, реакције ланчаног умножавања у реалном времену (ПЦР), изоловање укупних протеина и припрема различитих ћелијских фракција, одређивање концентрације протеина, Western blot, као и протоколи везани за различита хистолошка и хистохемијска бојења (имунопероксидазно и имунофлуоресцентно бојење, као и бојење перјодном киселином и Шифовим реагенсом). На крају овог поглавља представљене су статистичке методе (Shapiro-Wilk и Kolomogorov-Smirnov тест, Studentov t тест, двосмерна анализа варијансе праћена Bonferroni тестом) коришћене за обраду добијених резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** подељено је на 10 целина и документовано 21 сликом. У првој целини овог поглавља аутор констатује да шесточасовно гладовање није значајно смањило телесну масу експерименталних животиња. Наредна целина се односи на утицај краткоратног гладовања на испитиване биохемијске параметре у серуму, и цереброспиналној течности. Кандидаткиња констатује да је третман довео да смањења концентрације глукозе и инсулина у системској циркулацији, али не и у цереброспиналној течности. Концентрација кортикостерона у крви такође је била непромењена након краткотрајног гладовања. У трећој целини овог поглавља наведено је да је у хипоталамусу, осим концентрације инсулина, била повећана и релативна експресија иРНК за овај хормон, док је у четвртој овај резултат допуњен описом да је (про)инсулинска имунопозитивност детектована у неуронима перивентрикуларног једра хипоталамуса краткотрајно изгладњиваних пацова, као и у епендимским ћелијама које се налазе уз трећу мождану комору. Пета целина у оквиру поглавља РЕЗУЛТАТИ бави се утицајем краткотрајног гладовања на експресију, активацију и неуроанатомску дистрибуцију рецептора за инсулин. Аутор наводи да је третман довео до повећања заступљености, како укупне, тако и активираних форме (pIR-Tyr1361) рецептора за инсулин у мембранској

фракцији протеина изолованих из хипоталамуса. Као и у случају проинсулина, присуство активираних форме рецептора детектовано је у перивентрикуларном једру хипоталамуса изгладњиваних животиња. Шеста целина посвећена је утицају краткотрајног гладовања на експресију GLUT 1-4 у хипоталамусу. Истакнуто је да је, осим у случају GLUT4 који је остао непромењен, гладовање повећало заступљеност свих осталих испитиваних изоформи транспортера за глукозу у мембранској фракцији протеина изолованих из хипоталамуса. У седмој целини наведени су региони хипоталамуса, као и типови ћелија који експримирају различите изоforme GLUT. У случају GLUT1, интензиван сигнал детектован је у епендимским ћелијама, таницитима, али и у ендотелним ћелијама крвних судова окружених астроцитним стопалима. GLUT2 је детектован у неуронима хипоталамуса, у оквиру паравентрикуларног једра и вентромедијалног хипоталамуса. Такође је показано да епендимске ћелије и таницити експримирају GLUT2, као и да су наставци таницита у контакту са неуронима лучног једра који експримирају GLUT2. GLUT3 је детектован у перивентрикуларном и паравентрикуларном једру. GLUT4 је детектован у епендимским ћелијама и спорадично у паренхиму хипоталамуса. У осмој и деветој целини која се баве ефектом краткотрајног гладовања на метаболизам гликогена у јетри и хипоталамусу, наведено је да примењени третман није утицао на количину и неуроанатомску дистрибуцију гликогена у хипоталамусу, иако је његова количина у јетри била смањена. У оквиру осме целине наведено је и да је концентрација лактата у цереброспиналној течности и серуму остала непромењена након шесточасовног гладовања. У последњој десетој целини овог поглавља изложени су резултати који се односе на утицај краткотрајног гладовања на експресију молекула учесника сигналних путева активираних дејством инсулина. Том приликом констатовано је да је примењени третман једино утицао на експресију киназе регулисане екстраћелијским сигналимa (ERK1/2). Наиме, краткотрајно гладовање довело је до смањења експресије укупне ERK1/2, али и до повећања заступљености активираних форме овог ензима. Експресија преосталих испитиваних молекула IRS1, IRS2, PI3K, AKT1/2/3 и mTOR (eng., mammalian Target Of Rapamycin) није била промењена након шесточасовног гладовања.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** представљена је упоредна анализа приказаних резултата и релевантних података објављених у научној литератури. Поглавље је отворено разматрањем података добијених у вези са концентрацијом глукозе у крви и количине гликогена у јетри. С обзиром да је количина гликогена у јетри била смањена, а да је концентрација глукозе у крви, иако значајно смањена у односу на контролну вредност, и даље била у нормогликемичном опсегу, аутор констатује да су се изгладњиване животиње у тренутку жртвовања налазиле у почетној, гликогенолитичкој фази метаболичког одговора на гладовање.

Кандитакиња потом дискутује резултате у вези са експресијом инсулина, и на основу чињенице да је у хипоталамусу забележено повећано присуство, како иРНК за инсулин, тако и самог инсулина, констатује да се током краткотрајног гладовања у поменутом можданом региону одиграла *de novo* синтеза овог хормона. Овакав закључак додатно је поткрепљен резултатом да је код изгладњиваних јединки у неуронима перивентрикуларног једра хипоталамуса, као и у епендимским ћелијама које се налазе уз трећу мождану комору, детектовано присуство проинсулина, који представља форму овог хормона присутну у секреторним везикулама ћелија које га синтетишу.

Аутор затим поставља питање адаптивног значаја гладовањем изазваних промена експресије инсулина у хипоталамусу, и у том контексту разматра резултате у вези са експресијом и анатомском дистрибуцијом различитих изоформи GLUT. Пре свега, анализом резултата добијених за изоforme GLUT1 карактеристичне за ендотелне ћелије капилара, односно астроците, изведен је закључак да се током гладовања фаворизује олакшана дифузија глукозе из системске циркулације у паренхим хипоталамуса.

Упоредном анализом резултата добијених за инсулин-зависне и за инсулин-независне изоформе, као и типове ћелија који их експримирају у оквиру ЦНС, колегиница Тамара Дакић закључује да краткотрајно гладовање доводи до повећања изоформи GLUT карактеристичних за неуроне и епендимске ћелије, али не и за астроците. На основу поменутих резултата и чињенице да није забележена коекспресија активiranог рецептора за инсулин и глукозних транспортера, изведен је закључак да су под испитиваним околностима промене у стопи уградње транспортера за глукозу у ћелијску мембрану регулисане механизмима који не зависе од дејства инсулина. Дискусија на тему глукозног метаболизма је заокружена разматрањем резултата који су показали да количина гликогена у хипоталамусу није била промењена након краткотрајног гладовања, иако је у јетри било забележено смањење количине овог макромолекула.

У последњој тематској целини ДИСКУСИЈЕ кандидаткиња разматра резултате везане за утицај гладовања на експресију молекула (рецептор за инсулин, IRS1, IRS2, гликоген синтаза 1, mTOR, ERK1/2) коју учествују у реализацији инсулином активираних сигналних путева. Констатовано је, да колективно посматрано, ова група резултата указује да током краткотрајног гладовања долази до активације инсулинског рецептора, које је праћено повећањем количине активираних ERK1/2.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** на јасан начин су изведени закључци који произлазе из добијених резултата, а истовремено дају и одговор на циљеве који су постављени на почетку израде ове докторске дисертације. Још једном је истакнуто да је током краткотрајног гладовања повећана, како експресија иРНК за инсулин у хипоталамусу, тако и колчина овог хормона у паренхиму испитиваног možданог региона. Констатовано је да је новосинтетисани инсулин био детектован у неуронима перивентрикуларног једра хипоталамуса, као и у епендимским ћелијама које се налазе уз трећу možдану комору. Анализом резултата добијених у вези са заступљеношћу различитих изоформи глукозног транспортера, изведен је закључак да краткотрајно гладовање повећава експресију оних GLUT који су карактеристични за неуроне и епендимске ћелије, али не и за астроците. Такође је наведено да краткотрајно гладовање не мења анатомску дистрибуцију овог мембранског транспортера у оквиру хипоталамуса. На крају, на основу резултата добијених у вези са утицајем краткотрајног гладовања на експресију протеина укључених у инсулинску сигналну трансдукцију, изведен је закључак да адаптивни значај гладовањем изазваног повећања експресије инсулина у хипоталамусу није у вези са регулацијом мембранског транспорта глукозе и метаболизма гликогена.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи списак од 241 цитиране библиографске јединице. Адекватно употреба литературних података одражава висок степен упознатости кандидата са проблематиком везаном за ову докторску дисертацију.

### **Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:**

Б1. Радови у часописима међународног значаја

#### **M22**

1. **Tamara Dakic**, Tanja Jevdjovic, Mina Peric, Ivana Bjelobaba, Milica Markelic, Bojana Milutinovic, Iva Lakic, Nebojsa Jasnica, Jelena Djordjevic and Predrag Vujovic. Short-term fasting promotes insulin expression in rat hypothalamus. *European Journal of Neuroscience* 2017 46 (1): 1730-1737. <https://doi.org/10.1111/ejn.13607>

#### **M22**

2. **Tamara Dakic**, Tanja Jevdjovic, Iva Lakic, Sinisa Djurasevic, Jelena Djordjevic and

Predrag Vujovic. Food for Thought: Short-Term Fasting Upregulates Glucose Transporters in Neurons and Endothelial Cells, But Not in Astrocytes. *Neurochem Res* 2019 44(2): 388-399. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2685-6>

B2. Kongresna saopšteња na skupovima međunarodnog značaja

#### M34

1. Sinisa Djurasevic, **Tamara Dakic**, Tanja Jevdjovic, Katarina Radisavljevic, Iva Lakic, Nebojsa Jasnic, Predrag Vujović and Jelena Djordjevic. Short-term fasting differentially regulates hypothalamic and hippocampal insulin levels. BIT's 6<sup>th</sup> Annual World Congress of Food and Nutrition, September 15-17, 2017, Shenyang, China. Book of abstracts, P169

2. **Tamara Dakic**, Tanja Jevdjovic, Iva Lakic, Mina Peric, Nebojsa Jasnic, Jelena Djordjevic and Predrag Vujovic. Short-term fasting increases the levels of glucose transporters in the male rat hypothalamus. 7th CONGRESS OF SERBIAN NEUROSCIENCE SOCIETY with international participation October 25-27, 2017. Belgrade, Serbia, P117.

3. **Tamara Dakic**, Milica Vranic, Tanja Jevdjovic, Iva Lakic, Jelena Djordjevic and Predrag Vujovic. Effect of short term fasting on hypothalamic insulin expression and signaling. IUBMB Advanced School of Nutrition, Metabolism and Aging, Petnica, Serbia, 15-19. October 2018, Book of abstracts p39, ISBN 978-86-80335-07-0

B3. Kongresna saopšteња na skupovima domaћeg značaja

#### M64

1. **Tamara Dakic**, Tanja Jevdjovic, Iva Lakic, Nebojsa Jasnic, Jelena Djordjevic, Predrag Vujovic. Hypothalamic insulin expression increases after the short term fasting. First Congress of Molecular Biologists of Serbia (CoMBoS), Belgrade, September 20-22, 2017. Book of abstracts, P29, ISBN 978-86-7078-136-8

2. Predrag Vujović, **Tamara Dakić**, Tanja Jevđović, Iva Lakić, Nebojša Jasnić, Siniša Đurašević, Jelena Đorđević. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na glukoznu homeostazu u hipotalamusu pacova. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, 25-30.09.2018, knjiga sažetaka str.149, ISBN 978-86-81413-08-1

3. **Tamara Dakić**, Milica Vranić, Predrag Vujović, Jelena Đorđević. Uticaj kratkotrajnog gladovanja na signalni put insulina u hipotalamusu pacova. Drugi kongres biologa Srbije, Kladovo, 25-30.09.2018, knjiga sažetaka str.169, ISBN 978-86-81413-08-1

### **Мишљење и предлог Комисије:**

Комисија сматра да је докторска дисертација **Тамаре Б. Дакић** написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме и да садржи све релевантне елементе неопходне за овакву врсту рада. Кандидатиња је у својој докторској тези свеобухватно обрадила актуелну тему порекла и функције инсулина у централном нервном систему, а новодобијени резултати значајно доприносе бољем упознавању сложености механизма који регулишу експресију овог хормона у хипоталамусу. Нарочит значај има по први пут објављени резултат који се односи на могућност повећања експресије инсулина и у стању гладовања, а не искључиво постпрандијално. Оригиналноост и научни допринос ове дисертације огледају се и у резултатима који указују на различит утицај гладовања на експресију изоформи глукозног транспортера у неуронима и глијским ћелијама, као и на разлике у метаболизму гликогена у јетри и хипоталамусу под испитиваним околностима.

Имајући у виду све претходно наведено, као и да су резултати поменутих истраживања објављени у два научна рада у истакнутим међународним часописима, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри **Тамари Б. Дакић** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Ефекат краткотрајног гладовања на експресију инсулина и инсулинску сигнализацију у хипоталамусу пацова**”.

У Београду, (11.03.2019) године.

### **КОМИСИЈА:**

---

др Предраг Вујовић, ванредни професор,  
Универзитет у Београду- Биолошки факултет

---

др Тања Јевђовић, доцент, Универзитет у  
Београду-Биолошки факултет

---

др Ивана Бјелобаба, виши научни сарадник,  
Универзитет у Београду, Институт  
за биолошка истраживања „Синиша Станковић“